Université Mustapha Ben Boulaid Batna-2
Faculté : SNV
Département : Microbiologie/Biochimie
Spécialité : Microbiologie (L3)
TD4 d'enzymologie

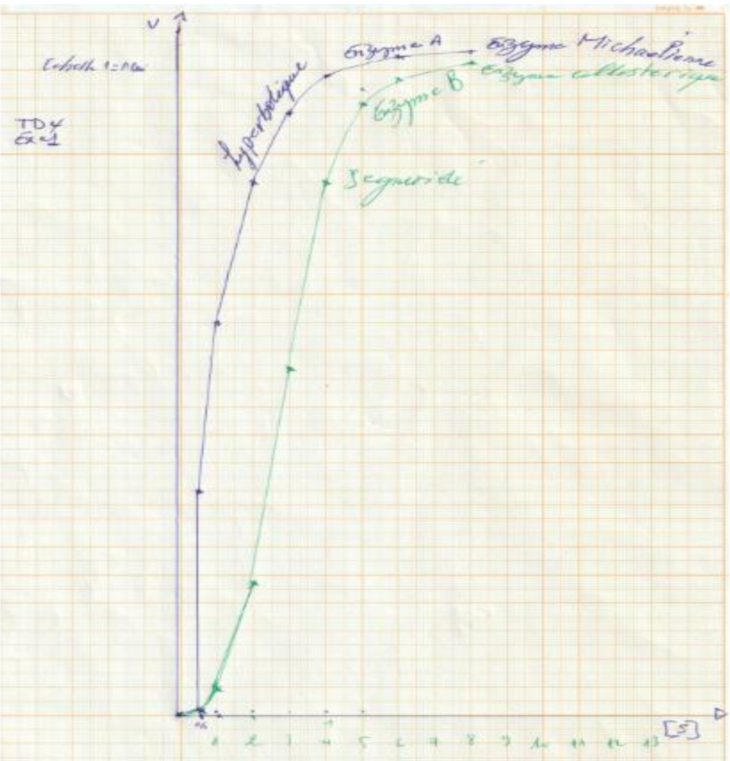
Exercice01 : L'étude de la cinétique de deux (02) enzymes A et B a donné les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessous.

$[S]\times10^{-3}$ M	V enzyme A($\mu mol.min^{-1}$)	V enzyme B ($\mu mol.min^{-1}$)
0.00	0.00	0.00
0.50	8.80	0.30
1.00	14.00	1.00
2.00	19.00	4.70
3.00	21.50	12.40
4.00	22.80	19.00
5.00	22.30	21.80
6.00	23.50	22.80
8.00	23.60	23.30

1) Tracer la courbe en présentant la vitesse en fonction de [S] et déduire le type des enzymes A et B

2) expliquer l'allure des courbes.

Solution d' exercice 01 :



La courbe A représente v= f([S] pour une **enzyme Michaelienne** et la courbe a une **allure hyperbolique** indiquant l'influence de la concentration du substrat .
La courbe B représente v= f([S] pour une **enzyme allostérique** et la courbe a une **allure sigmoïdale** indiquant un effet coopératif(Quand une molécule ligand L (substrat, inhibiteur ou activateur) se fixe sur un des sites disponibles sur l'enzyme allostérique, elle induit une modification conformationnelle de l'enzyme transmise aux autres sites susceptibles de lier L).

Exercice 02 :

La phosphotransacétylase catalyse la réaction :
Acétyl-CoA + Pi acétylphosphate + CoA-SH
La constante de Michaelis(Km) de la phosphotransacétylase de Bacillus subtilis pour l'acétyl-CoA est 6.10^{-4} M. En présence du palmityl-CoA , qui est un inhibiteur compétitif de la phosphotransacétylase , à la concentration de$1,8.10^{-5}$ M, on a mesuré vi (µmoles d'ester clivé par minute par mg de protéine) pour différentes concentrations initiales d'acétyl-CoA.

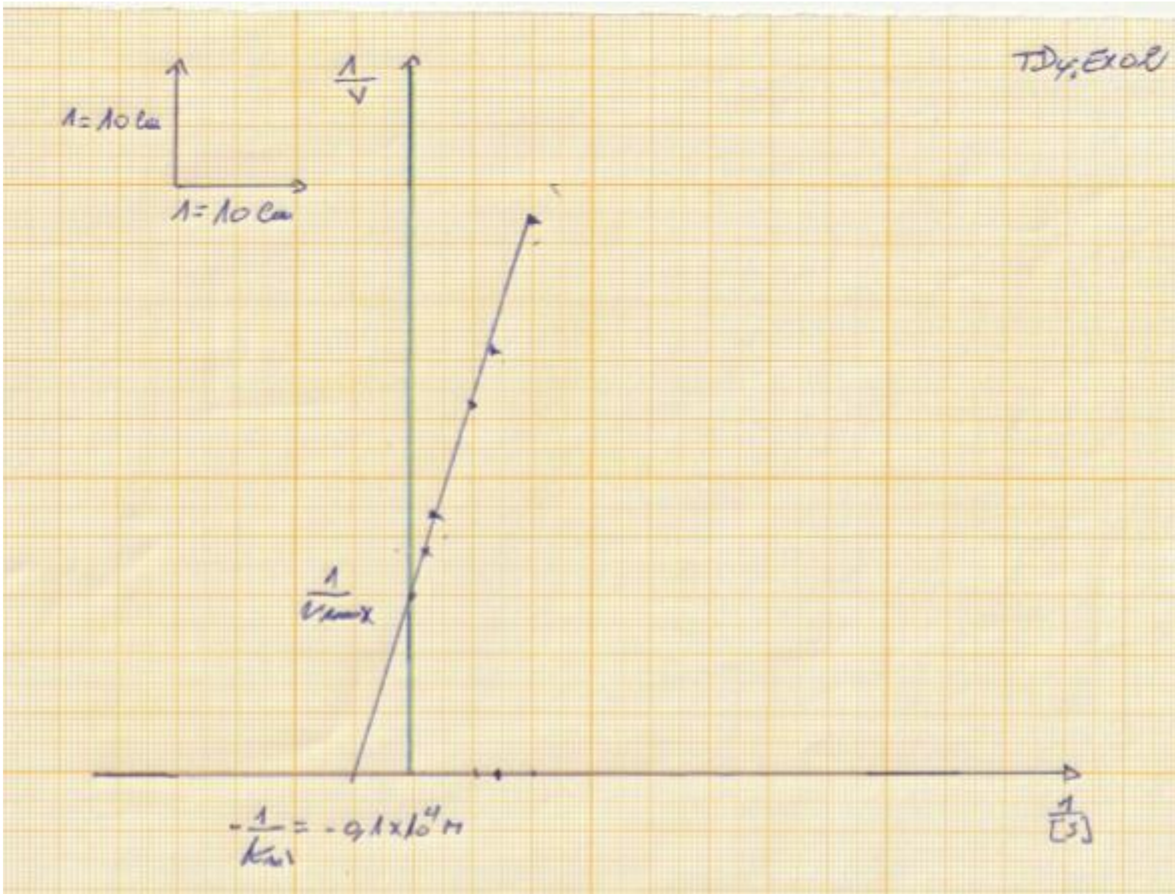
[Acétyl CoA]x10^4 (M)	Vi(µmol $min^1.mg^{-1}$)
5	1.06
7.5	1.37
10	1.59
25	2.27
50	2.63

A l'aide de la présentation de lineweaver-Burk, déterminer la constante de dissociation Ki du complexe enzyme-inhibiteur.

Solution d' exercice 02 :

Pour déterminer la constante de dissociation Ki du complexe enzyme-inhibiteur , on a besoin de calculer Le **Km′**(en présence d'inhibiteur) à l'aide de la représentation de Lineweaver-Burk**(1/V= f(1[S])**) qu'une droite qui coupe l'axe des ordonées **(1/V)** en 1/Vmax et celui des abscises à**(-1/Km)** qui nous permet de déterminer facilement les Km et Vmax d'une cinétique à partir du graphe.
1/V et 1/[S] sont présentés sur le tableau ci-dessous

[AcétylCoA]x10^4 (M)	1/[AcétyleCoA] =1/[S]	Vi(µ mole/min/mg)	1/V
5	**0.2**	**1.06**	**0.94**
7.5	**0.13**	**1.37**	**0.72**
10	**0.10**	**1.59**	**0.62**
25	**0.04**	**2.27**	**0.44**
50	**0.02**	**2.63**	**0.38**



* La droite obtenue, après extrapolation coupe l'axe 1/[S](1/[acétyle CoA]) en un point d'abscisse **– 1/Km′ = - 0.1x10^{4} M^{-1}**

Connaissant : Km =6.10 $^{-4}$M au lieu de 6.10^{-5}

[I] = 1.8.10^{-5} M

On doit calculer le Km′ à partir du graphe comme suit :

-1/Km′ = -0.1x10^{4} ⇒ Km′= -1/-0.1x10^{4} M^{-1} = 10x **10^{-4} M**

Sachant que l'inhibition et compétitve(mentionnée dans l'exercice) .

Donc $Km' = Km\ (1 + \frac{[I]}{KI})$ (voir chapitre05)

10x10^{-4} = 6x10^{-4}(1+ 1.8x10^{-5}/ Ki**)**

10x10^{-4} = 6x10^{-4}+ 6x10^{-4} x1.8x10^{-5} / Ki

10x10^{-4} – 6x10^{-4} = 10.8x 10^{-9}

4x10^{-4} = 10.8x10^{-9} / Ki

Ki = 10.8 x10^{-9}/ 4x10^{-4}

$\boxed{\textbf{Ki = 2.7x10}^{-5}\textbf{ M}}$

Exercice03 :

L'activité d'une enzyme est mesurée en fonction de la concentration en substrat, en absence et en présence d'un inhibiteur à une concentration de mM. On trouve les résultats suivants :

[S] en µM	V en µmol/min. I=0	V en µmol/min). I=2 mM
3.00	10.40	4.10
5.00	14.50	6.40
10.00	22.50	11.30
30.00	33.80	22.60
90.00	40.50	33.80

1 Déterminer Vmax et Km en absence et en présence de l'inhibiteur.

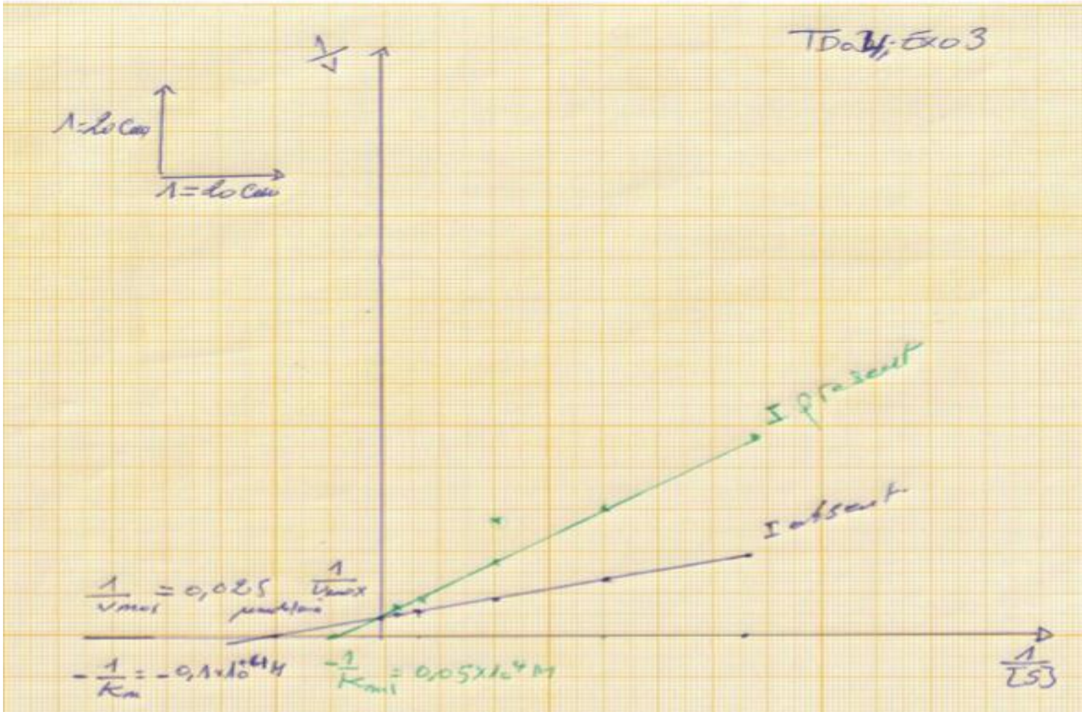
2 Indiquer le type d'inhibition en justifiant votre réponse.

3 Calculer la constante KI.

Solution exercice 03 :

Pour déterminer Vmax et Km on applique la méthodes la plus pratique et facile qui consiste en représentation de Lineweaver-Burk **(1/V= f(1/[S])** et on doit calculer 1/[S et sur 1/V comme ils sont présentés sur le tableau ci-dessous.

[S] en µM	1[S]	V en µmol/min I=0	1/V I=0	V en µmol/min I=2 mM	1/V I=2mM
3.00	0.33	10.40	0.096	4.10	0.24
5.00	0.20	14.50	0.068	6.40	0.15
10.00	0.10	22.50	0.044	11.30	0.088
30.00	0.033	33.80	0.029	22.60	0.044
90.00	0.011	40.50	0.024	33.80	0.029



1) **Détermination des Km et Vmax**

A)- en absence de l'inhibiteur

$-1/Km = -\ 0.1x10^{-6}$ M ⇒ **Km** = $1/0.1x10^{-6}$ M = **$10x\ 10^{6}$ M^{-1}**

1/Vmax= 0.025 ⇒ **Vmax** = 1/0.025 = **40 µ mol/min**

B)- en présence de l'inhibiteur

- 1/Km′= - 0.05 $x10^{-6}$ M ⇒ **Km′** = $-1/-0.05x10^{-6}$ M = **$20x10^{6}$ M**

1/Vmax′ = 0.025 ⇒ **Vmax′** = 1/0.025 = **40 µmol/min**

2)- On constate que la Vmax n'est pas modifiée**(Vmax= Vmax′)** tandis-que Km est changeé**(Km<Km′)** .

2) A partir de ces résultats ci-dessus(vmax inchangée et le Km modifié) on peut conclure que le type de l'inhibition est **compétitif.**

3) Sachant que l'inhibition et compétitive

Donc Km′ = Km(1+ [I]/ Ki) (voir chapitre 5)

$20x10^{6} = 10x10^{6}\ (1+ 2x10^{-3} / Ki)$

$20x10^{6} = 10x10^{6} + 10x10^{6}\ x2x10^{-3}/ Ki$

$20x10^{6} – 10x10^{6} = 20x10^{3} / Ki$

$10x10^{6} = 20x10^{3} /Ki$

Donc Ki = $20x10^{3} /10x10^{6} = 20/10x10^{3}$

$\boxed{\mathbf{Ki= 2x10^{-3}\ M}}$

Exercice04 :

S et I sont respectivement un substrat et un inhibiteur d'une enzyme. On mesure vi (µmole de substrat consommé par minute) pour différentes concentrations initiales de S, en l'absence et en présence de I(à la concentration de 10^{-6} M).

[s].10^3 (M)	I Absent	I présent
	Vi(µmole.min^{-1})	Vi(µmole.min-1)
1	0.290	0.167
1.5	0.380	0.230
2.5	0.510	0.330
5	0.690	0.500
10	0.800	0.670
20	0.900	0.800

1)- Porter en fonction de 1/[S], en l'absence et en présence de I.

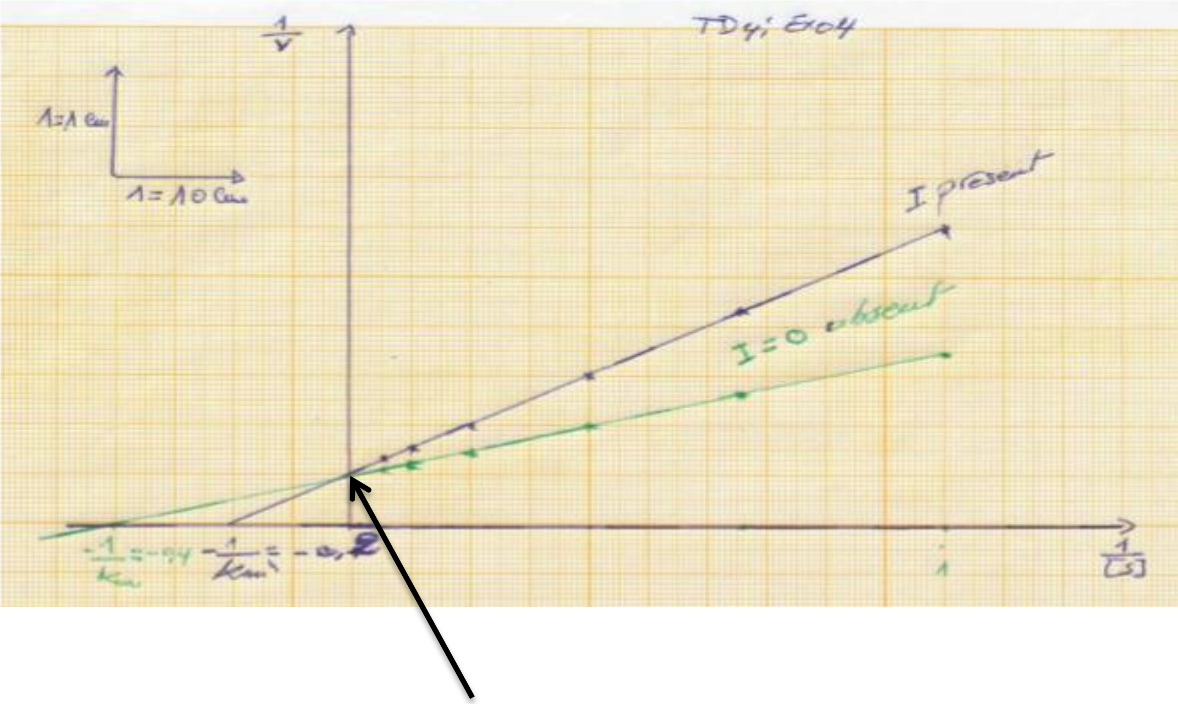
2)- Préciser le type de l'inhibition exercée par I sur l'enzyme

3)- Déterminer Km et Vmax en l'absence et en présence de I

Solution exercice04 :

1- **Pour porter 1/V en fonction de 1/[S] (1/V = f(1/[S]) en absence et en présence de de linhibiteur I, on va calculer 1/V et 1/[S] sur le tableau ci-dessous**

[S].10^3 M	1/[S]	I absent		I présent	
		Vi(µmole/min)	1/V	Vi(µmole/min)	1/V
1	1	0.290	3.44	0.167	5.98
1.5	0.66	0.380	2.36	0.230	4.34
2.5	0.40	0.510	1.96	0.330	3.030
5	0.20	0.610	1.44	0.500	2.20
10	0.10	0.800	1.25	0.670	1.49
10	0.05	0.900	1.11	0.800	1.25



1/**Vmax= 0.1 µmol/min**

2) le type de l'inhibition est compétitif, car vmax est inchangée et Km est modifié.
3)-Détermination des Vmax et Km en présence et en absence de l'inhibiteur.
A)- Détermination des vmax en absence de l'inhibiteur :
A partir du graphe on détermine Vmax et on constate que **1/vmax = 1/ vmax′⇒**

Vmax= vmax′(en présence d'inhibiteur)
1/Vmax = 0.1 ⇒ Vmax = 1/0.1 = **10 µmol/min**

B)- <u>Détermination des Km à partir du graphe</u>
*** En absence de l'inhibiteur**
-1/Km = -0.4×10^3 ⇒ Km = $-1/-0.4\times10^3$ = **2.5×10^{-3} M**

*** En présence de l'inhibiteur :**
-1/km′= -0.2×10^3 ⇒ Km′ = $-1/-0.2\times10^3$ **= 5×10^{-3}**

Km′> Km